

挥出了不可替代的优势作用,成为解决此类问题的双刃利剑。

参 考 文 献

- [1] 李克辛.技术性贸易壁垒的特征及应对措施.国际经济合作, 2004,225(9):59-61
LI Ke-xin.Characteristics and countermeasures of technical barriers to trade. International Economic Cooperation,2004,225(9):59-61
- [2] 解忠信.国外技术性贸易壁垒的新动向及我国的应对措施.黑龙江对外经贸,2011, 204(6):14-15
XIE Zhong-xin.New trends of foreign technical barriers to trade and Chinese countermeasures.Heilongjiang Foreign Economy and Trade,2011,204(6):14-15
- [3] 王冬霞.金融危机下医疗器械企业应对技术性贸易壁垒对策探讨.经济师,2009,241(3):239-241
WANG Dong-xia.Medical device company against technical trade barriers in financial crisis countermeasure.Economist,2009,241(3): 239-241
- [4] 商务部.韩国2011贸易投资环境报告.2011

- People's Republic of China Ministry of Commerce.Korea 2011 Trade and Investment Environment Report.2011
- [5] 胡玉华.我国中药出口主要技术壁垒及其应对.统计科学与实践,2010,305(3):18-20
HU Yu-hua.Main technical barriers to exports of traditional Chinese medicine in China and its countermeasures.Statistical Science and Practice,2010,305(3):18-20
- [6] 洪兰,庄严.欧盟植物药的技术性贸易壁垒对中药出口的影响.中国药房,2008,19(15):1121-1123
HONG Lan,ZHUANG Yan.EU herbal effect of technical trade barrier on export of Chinese medicine.China Pharmacy,2008,19(15): 1121-1123
- [7] 修婧.技术性贸易壁垒对中药出口的影响.当代经济,2008, 199(7上):86-87
XIU Jing.Effect of technical trade barrier on export of traditional Chinese medicine.Contemporary Economic,2008,7(part): 86-87

(收稿日期:2011年11月24日)

· 论 著 ·

清开灵注射液中间体银黄液中黄芩苷含量 近红外测定方法的建立和验证

吴志生,史新元,隋丞琳,杜敏,彭严芳,乔延江

(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

摘要:目的:建立清开灵注射液生产过程中中间体银黄液中黄芩苷的近红外定量模型,并对其进行方法学验证。方法:采用近红外透射模式,以高效液相色谱分析值为参考值,采用偏最小二乘回归法(PLS)建立黄芩苷含量的近红外定量校正模型。采用相关系数(R)、校正标准差(SEC)、预测标准差(SEP)等参数评价模型,并运用AP方法验证模型。结果:所建模型的 R_{cal} 和 R_{val} 为0.9978和0.9995,SEC和SEP为723.0 μ g/mL和513.8 μ g/mL,模型预测效果良好;在 β -期望容差区间为90%,容许极限为15%,风险性为10%的约束下,该模型各项分析指标满足分析要求,最低定量限为8.025 μ g/mL。结论:当黄芩苷含量大于8.025 μ g/mL时,所建近红外分析模型稳健可靠,可用于清开灵注射液生产过程中中间体银黄液中黄芩苷快速准确定量。

关键词:清开灵注射液;黄芩苷;近红外光谱;偏最小二乘回归

基金资助:国家“重大新药创制”专项(No.2010ZX09502-002),北京市支持中央在京高校共建项目(中药中试放大关键技术研究)

Development and validation of a NIR quantification method for the determination of baicalin in intermediates of Qingkailing Injection

WU Zhi-sheng, SHI Xin-yuan, SUI Cheng-lin, DU Min, PENG Yan-fang, QIAO Yan-jiang

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

通讯作者:乔延江,北京市朝阳区望京中环南路6号北京中医药大学中药学院,邮编:100102,电话:010-84738650, E-mail: yjqiao@263.net

Abstract: Objective: The feasibility of near-infrared spectroscopy (NIRS) for baicalin content analysis in intermediates of Qingkailing Injection was verified in this work. Methods: The NIR spectra were collected in the transmission mode. The reference method used for the baicalin determination was HPLC assay recommended by the Chinese Pharmacopoeia (CHP, 2010 Edition) for Qingkailing Injection. The model was developed based on partial least squares regression (PLS) and the R, standard error of calibration and prediction (SEC and SEP) was used for the evaluation of the model adequacy. A novel approach based on accuracy profile which allowed the acquisition of the lower limit of quantification (LLOQ) was used to validate the robustness and accuracy of PLS model. Results: Rcal, Rval, SEC and SEP were 0.9978, 0.9995, 723.0 $\mu\text{g/mL}$ and 513.8 $\mu\text{g/mL}$. The acceptance limits were set at $\pm 15\%$ while the maximum risk to obtain results outside these acceptance limits was set at 10%. The accuracy profile showed that PLS model was able to determine baicalin content, whose LLOQ was about 8 025 $\mu\text{g/mL}$. Conclusion: The conclusion illuminated the feasibility of the NIR method when the content of baicalin is greater than 8 025 $\mu\text{g/mL}$, and provided a guideline of NIR accurate measurement in rapid analysis of intermediates of Qingkailing Injection.

Key words: Qingkailing Injection; Baicalin; Near-infrared spectroscopy; Partial least squares regression

Fund assistance: National Science and Technology Major Projects of 'The Key New Drug Creation' (No.2010ZX09502-002), Joint Development Program Supported by Beijing Municipal Government for University Affiliated with Party Central Committee (Research of the TCM Pilot Production Scaling Up Technology)

近红外光谱(near infrared spectroscopy, NIRS)信息主要反映分子中C-H, N-H, O-H等基团的倍频与组合频振动吸收,近年来已被广泛应用于中药质量控制领域,有望发展成为中药生产过程质量控制的适宜技术^[1-5]。然而,由于NIRS谱带重叠严重,吸收信号较弱,NIRS的定量限及检测限较高,将该方法用于中药质量控制,还需对其进行严格的验证。

清开灵注射液临床疗效显著,具有清热解毒、化痰通络及醒神开窍的功效,用于中风偏瘫、肝炎及上呼吸道感染等多种疾病的治疗。本课题组在前期工作中已采用近红外光谱技术对清开灵注射液生产过程中中间体指标性成分定量方法学进行了研究,发现清开灵注射液指标性成分含量高低严重影响着近红外定量模型的准确性^[6]。

为此,本研究以清开灵注射液生产过程重要中间体银黄液为研究载体,采用近红外光谱技术建立银黄液中指标成分黄芩苷的近红外定量模型,并运用基于随机误差和系统误差的轮廓精度(accuracy profile AP)分析方法对该模型进行验证,阐明该定量方法的可靠性,以期对中药体系近红外定量模型的验证提供参考^[7-9]。

材料与方法

1. 仪器和试剂 XDS型近红外光谱仪(丹麦FOSS仪器有限公司),I100型高效液相色谱仪包括四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)及HP数据处理工作站(美国Agilent公司),黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110777-201005),色谱级甲醇(美国Tedia公司),磷酸(天津大学试剂厂,分析级),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),6个批次的清开灵注射液中间体银黄液样本由北京中医药大学附属药厂提供。

2. 光谱条件 采用透射模式采集光谱,以仪器内部的空气为背景,分辨率为0.5nm,扫描范围400~2 500nm,扫描次数32次,每个样品平行测定3次,取平均光谱,为了获得稳健的近红外模型,实验设计采用2名不同操作者于不同天数(2d)采集近红外光谱数据,共144条平均光谱。

3. 色谱条件 SunFire C₁₈色谱柱(4.6×150mm, 5 μm , Waters);流动相:甲醇-水-磷酸(47:53:0.2);检测波长:276nm,流速:1mL/min,柱温:30℃,进样量:10 μL 。

4. 样品制备 按照现行2010年版《中华人民共和国药典》清开灵注射液项下高效液相色谱法,分别测定6批清开灵注射液中间体银黄液黄芩苷含量,而后每批样品均用纯净水稀释成一系列浓度30、20、15、10、5、1mg/mL,共36个样本。分别随机取其中的3批样本作为训练集,剩下3批样本作为预测集。

5. 数据处理 运用VISION软件(丹麦FOSS公司)对扫描光谱数据进行数据预处理和模型计算;运用e.noval 3.0软件对模型预测性能进行验证。

结果

1. 光谱预处理方法筛选 图1为所采集的144条近红外原始光谱。由图1可知,原始光谱重叠严重,并伴有随机噪声、基线漂移等干扰因素。因此,需运用合理的光谱预处理方法消除各种噪声和干扰因素,以提取近红外光谱中待测对象的特征信息。本研究比较了一阶微分(1st derivative, 1st)、二阶微分(2nd derivative, 2nd)、标准正则变换(standard normal variate, SNV)、基线校正(baseline correction, BC)、Savitzky-Golay平滑(s.g.)、N点平滑(N-point smooth, NPS)、多元散射校正(multivariate scatter correction, MSC)及一系列组合预处理方法,对1

100~1 900nm光谱波段所建偏最小二乘回归(PLS)模型性能的影响(1 900~2 500nm波段内光谱波动较大,故剔除此处波段)。经不同预处理方法获得PLS模型的预测残差平方和(PRESS)值,结果见图2。其中一阶微分(1st)加上N点平滑(NPS)组合预处理法PRESS值最小,因此采用此光谱预处理方法。

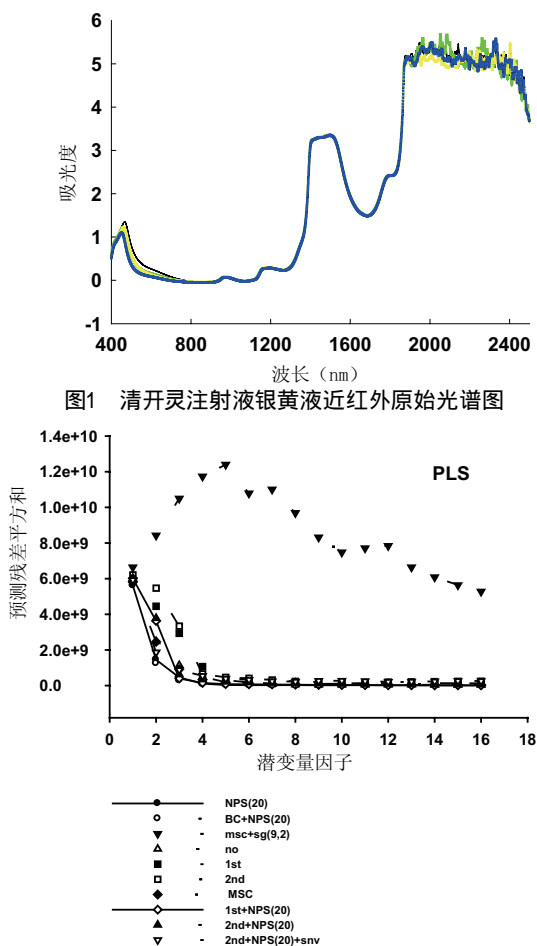


图2 不同光谱预处理方法PRESS值图

2. PLS模型的建立 采用PLS法,内部四折交叉验证(cross-validation),将光谱数据与样品的HPLC分析结果相关联建立校正模型。模型的潜变量个数确定为7,此时交叉验证均方根误差较小。采用3批外部样本集对模型预测性能进行验证,模型预测值与HPLC测定值的相关性见图3。该模型的SEC和SEP分别为723.0 μ g/mL和513.8 μ g/mL,表明其具有良好的预测性能。

3. 偏最小二乘回归模型的验证

3.1 模型准确性 在90% β -期望容差区间,15%容许极限,10%风险约束条件下,对PLS模型进行验证,结果见图4。在1 099~5 000 μ g/mL浓度范围内,平均偏差线和90% β -期望容差区间线波动较为明显,在1 099 μ g/mL浓度水平,模型预测相对偏差达到

$\pm 120\%$,说明银黄液中黄芩苷在此浓度水平时,该模型预测结果相对不准确。

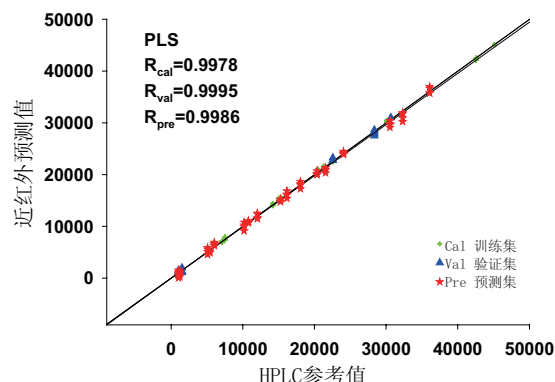
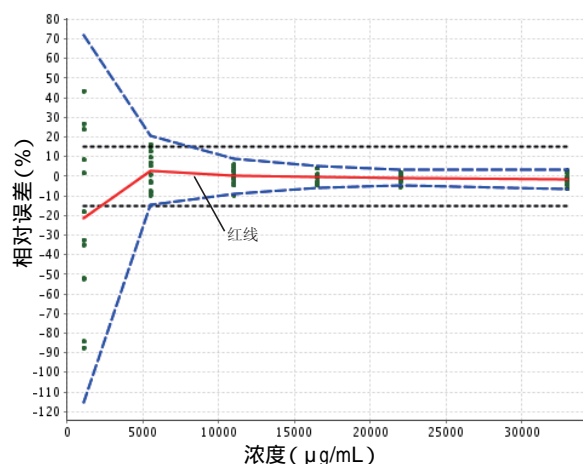


图3 近红外预测值与HPLC参考值相关性图



注:深色点线:容许极限线;浅色点线:90% β -期望容差区间线;红色实线:平均偏差线。

3.2 模型精密性 模型精密性包括重复性和中间精密度。由表1可知,黄芩苷浓度低于1 099 μ g/mL时,该模型重复性和中间精密度相对标准偏差值较大,达到32.900%和45.230%,说明了模型对该浓度预测不准确。

表1 PLS定量模型的重复性和中间精密度(%)

浓度(μ g/mL)	重复性(RSD)	中间精密度(RSD)
1 099	32.900	45.230
5 496	9.315	9.315
10 992	3.851	4.484
16 488	2.706	2.896
21 983	2.063	2.104
32 975	2.224	2.630

3.3 模型不确定性和风险性 由表2可知,浓度低于1 099 μ g/mL,该模型不确定性和风险性较大,达到97.51%和79.13%,其它浓度水平不确定性和风险性符合分析测试要求。

表2 PLS定量模型的不确定性和风险性(%)

浓度(μg/mL)	相对扩展不确定度	风险性
1 099	97.510	79.130
5 496	19.390	16.550
10 992	9.522	1.241
16 488	6.087	0.063
21 983	4.394	0.004
32 975	5.593	0.077

3.4 模型线性和定量限 该模型预测回归方程为: $Y=60.36+0.9856X$, $r^2=0.9972$, 相关性良好, 见图5; 该模型对黄芩苷的最低定量限为8 025μg/mL。

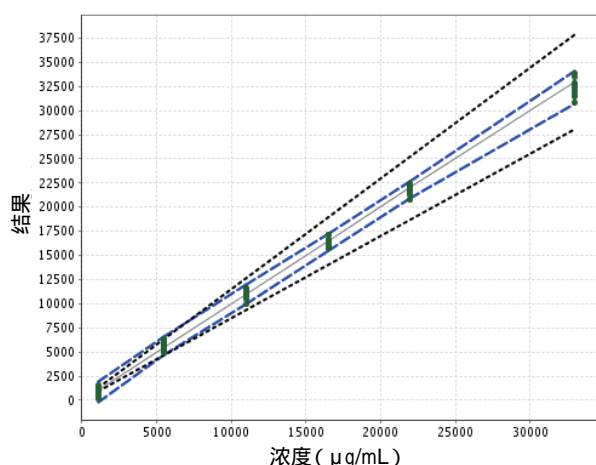


图5 近红外预测线性轮廓图

注: 深色点线代表容许极限线, 浅色点线代表90%β-期望容差区间线。

讨论

近红外光谱具有吸收强度弱、谱带复杂、相互重叠等特征, 将其用于成分复杂、含量较低的中药制剂定量分析, 所建模型更需要系统验证。传统的统计学指标能一定程度评价模型的性能, 但不足以充分验证模型的可靠性。本研究引入了符合FDA和ICH验证标准的分析方法, 为近红外定量模型的验证提供了指导。

近红外分析技术作为20余项热门分析技术之一, 已被2010版《中华人民共和国药典》二部收录为法规分析技术。然而, 其指导原则至今尚没有统一的验证方法学规范。本研究采用的AP分析方法包括了准确性、真实性、精密度、定量限、风险性、线性、回收率等指标, 与常规的HPLC定量方法相比, AP方法基于随机误差和系统误差理论, 给出了图形化参数

分布, 引入分析方法β-期望容差区间参数, 使得分析方法本身的风险性更易辨识。该方法可为近红外定量分析方法学的建立提供借鉴。

参考文献

- [1] Li W L, Xing L H, Fang L M, et al. Application of near infrared spectroscopy for rapid analysis of intermediates of Tanreqing injection. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 350-358
- [2] Rao Y L, Xiang B R. Determination of total ash and acid-insoluble ash of Chinese herbal medicine *prunellae spica* by near infrared spectroscopy. *Yakugaku Zasshi*, 2009, 129: 881-886
- [3] Y Mohri, Y Sakata, M Otsuka. Quantitative evaluation of glycyrrhizic acid that affects the product quality of Kakkonto extract, a traditional herbal medicine, by a chemometric near infrared spectroscopic method. *J Near Infrared Spectrosc*, 2009, 17: 89-100
- [4] 史新元, 张燕玲, 王耘, 等. 中药生产过程中质量控制的思考. *世界科学技术-中医药现代化*, 2008, 10: 121-125
SHI Xin-yuan, ZHANG Yan-ling, WANG Yun, et al. Process quality control for TCM production. *World Sci Tech*, 2008, 10: 121-125
- [5] 宰宝祥, 史新元, 乔延江. 基于支持向量机的中药片剂包衣质量分析. *中国中药杂志*, 2010, 35(6): 699-702
ZAI Bao-chan, SHI Xin-yuan, QIAO Yan-jiang. Analysis of Chinese medicine tablets on coating quality based on support vector machine. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(6): 699-702
- [6] 朱向荣, 李娜, 史新元, 等. 近红外光谱与组合的间隔偏最小二乘法测定清开灵四混液中总氮和栀子苷的含量. *高等学校化学学报*, 2008, 29(5): 906-911
ZHU Xiang-rong, LI Na, SHI Xin-yuan, et al. Analysis of geniposide and total nitrogen content in Qingkailing injection intermediate by near infrared spectroscopy and synergy interval partial least squares. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2008, 29(5): 906-911
- [7] E Ziemons, J Mantanus, P Lebrun, et al. Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 510-516
- [8] J Mantanus, E Ziemons, P Lebrun, et al. Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development and validation. *Anal Chim Acta*, 2009, 642: 186-192
- [9] J Mantanus, E Ziemons, P Lebrun, et al. Active content determination of non-coated pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development, validation and reliability evaluation. *Talanta*, 2010, 80: 1750-1757

(收稿日期: 2011年11月27日)